


SEPARATION OF POLY (BETA-HYDROXY BUTYRIC ACID) FROM BACTERIAL CELL**Publication number:** JP57065193**Publication date:** 1982-04-20**Inventor:** JIYON UOOKAA; JIYONASAN RICHIIYAADO
HOITSUTON; BAARII ARUDAASON**Applicant:** ICI LTD**Classification:****- international:** C12P7/62; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/42**- european:** C12P7/62A**Application number:** JP19810127312 19810813**Priority number(s):** GB19800026460 19800813**Also published as:** US4358583 (A)**Report a data error he**

Abstract not available for JP57065193

Abstract of corresponding document: US4358583

Poly (beta -hydroxy butyric acid), PHB, is extracted from a suspension of bacterial cells by causing the cells to flocculate, by pH modification, optionally with heating, and then extracting the PHB from the flocculated cells with a suitable extraction solvent. Flocculation of the cells renders subsequent separatic of the PHB solution from the cell debris more facile. Preferably lipids are extracted from the flocculated cells before contact with the PHB extraction solvent.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑩ 公開特許公報 (A)

昭57-65193

④ Int. Cl.³
C 12 P 7/42

識別記号

庁内整理番号
6760-4B

④ 公開 昭和57年(1982)4月20日
発明の款 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

④ 菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

④ 特 願 昭56-127312

④ 出 願 昭56(1981)8月13日

優先権主張 ④ 1980年8月13日 ④ イギリス
(GB)④ 8026460

④ 発 明 者 ジョン・ウオーカー

イギリス国クリーブランド・ス
トックトン・オン・ティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

④ 発 明 者 ジョナサン・リチャード・ホイ

ットン

イギリス国クリーブランド・ス
トックトン・オン・ティーズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)
④ 出 願 人 インベリヤル・ケミカル・イン
ダストリーズ・リミテッド
イギリス国ロンドン市エスダブ
リユー・1ビー・8 ジェイ・エフ・ミ
ルバンク・インベリヤル・ケミ
カル・ハウス(番地なし)

④ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. [発明の名称]

菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

2. [特許請求の範囲]

(1) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を含む細菌の菌体を、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を可溶な溶剤と溶解させ、そしてポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を溶解して含む溶剤を菌体破片層から分離することにより、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)含有菌体の水性懸濁液からポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を分離する方法であつて：水性懸濁液中の菌体を、懸濁液のpHを酸での処理により2～5の範囲内の値に下げる工程と、それと組合せ(1)上記酸性化前記水性懸濁液のpHを8～12の範囲内の値に上げるために水性懸濁液をアルカリで処理する工程および(1)上記酸性化の前もしくは後に水性懸濁液を50～200℃の範囲内の温度に加熱する工程の少なくとも一とにより、乾燥させ、次いで乾燥菌体を水性懸濁液から分離してからその菌

体を抽出溶剤と混合させる；ことを特徴とする細菌の菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法。

(2) 懸濁液のpHを8.5～12の範囲内の値に上げ；その懸濁液に加圧下のスチームを射出することにより加熱し；次いで懸濁液を3～5の範囲内のpHにまで酸性化する；ことにより懸濁液中の菌体を乾燥させることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) 菌体懸濁液をスチームの射出により60～100℃の範囲内の温度に加熱することを特徴とする特許請求の範囲第1または2項に記載の方法。

(4) ポリ(ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤との溶解前に、細菌の菌体に関連した脂質を、酸処理を溶解しうるがポリ(ヒドロキシ酪酸)を溶解しえない溶剤との溶解により乾燥菌体から抽出し、そして脂質を溶解して含む酸溶剤を乾燥菌体から分離除去することを特徴とする特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。

(5) 乾燥菌体を60～90℃の範囲内の温度で所

炭油抽出剤とを配合する特許請求の範囲第4項に記載の方法。

(6) 脂質抽出剤はアセトンまたはメタノールである特許請求の範囲第4または5項に記載の方法。

(7) 脂質抽出後かつポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用剤との接触前に、被集菌体を乾燥させることにより多孔性顆粒状物とし、これをポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4〜6項のいずれかに記載の方法。

(8) 被集菌体を脂質抽出剤から分離後に、被集菌体を水でスラリー化してからポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4〜8項のいずれかに記載の方法。

(9) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)抽出用剤はクロロホルム、1, 2-ジクロロエタンおよび塩化メチレンから選択されたものである特許請求の範囲第1〜8項のいずれかに記載の方法。

の抽出剤としては、炭素カーボネート類、例えば1, 2-プロピレンカーボネート(米国特許第4,101,538号参照)；クロロホルム(米国特許第4,275,510号参照)；および1, 2-ジクロロエタン(欧州特許出願第15128号明細書参照)がある。

米国特許第3,275,610号明細書には、その他の固体処理法、すなわち超音波振動法、磨砕法、フレンチプレス法、凍結/凍解サイクル法およびリソチウム処理法が記載されているが、前記の欧州特許出願明細書に記載されているような、固体懸濁液(例えば水性培地で微生物を適当な炭素およびエネルギー源で培養することにより得られるような菌体懸濁液)の噴霧乾燥またはフラッシュ乾燥でも、PHBを菌体から抽出可能とするに充分な菌体破壊が生じうる。

これらの方法の欠点は、PHB含有菌体を固体破砕から分離する必要があることである。菌体の寸法が微小であり、従つて液体の破片の寸法が微小である故に、前述のような分離法には従来

3. [発明の詳細な説明]

本発明は、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸) (以下PHBと略記する) の抽出に関する。

PHBはプラスチック材料として有用な熱可塑性ポリエステルである。PHBは菌体の菌体内において顆粒状のエネルギー保存物質として多量の菌体によつて蓄積される。

PHB含有菌体はそのまま吸着材料として使用できるが(例えば米国特許第3,107,172号明細書参照)、菌体物質の残部からPHBを分離することが一般に文献に記載されている。

このようなPHB分離を行うのに提案されている諸方法の中には、アセトンでの処理のような方法によつて菌体を破壊し、次いでPHBを可溶な溶剤で処理することにより被集菌体から抽出する方法がある。このような方法の例は、解剤として塩化メチレンおよびエタノールの混合物またはピリジンを用いる米国特許第3,088,959号および第3,044,694号明細書記載の方法である。菌体中で産生された形態にあるPHB用のその他

から問題があつた。このような難点は、クロロホルムを溶剤として利用する場合におけるようにPHB含有菌体が比較的粘稠であるときに顕著である。前述の欧州特許出願明細書に記載されるように、若干の場合には、水性菌体懸濁液を、適当な菌体破壊工程の後に、適当なPHB用溶剤と接触させ、次いで溶剤相と水性相とに分離させることからなる湿式方法によつて、PHBを抽出しうる。しかしながら溶剤/水性両相の分離は遅くしかも不完全でありうる。

ここに我々は、菌体懸濁液を乾燥工程に付すならば、その乾燥に必要とされる処理中に充分な菌体破壊が生じて菌体破砕物からのPHBの抽出を可能としうることを発見した。また菌体乾燥の結果として、菌体破砕物からのPHB含有菌体の分離が一層容易に達成しうる。

従つて、本発明によれば、PHB含有菌体の水性懸濁液からPHBを分離する方法であつて、懸濁液のpHを酸での処理により2〜5の範囲内の値とし、かつ懸濁液を酸性化前にアルカリで処理

してそのpHを8~12の範囲内の値に上げ、および/または酸性化前もしくは後に50~200℃の範囲内の温度で加熱することにより懸濁液を凝集させ、凝集固体を水性媒体から分離し、凝集固体を、PHBを可溶性溶剤と接触させることにより凝集固体からPHBを抽出し、そしてPHBを溶解して含む溶剤を固体破片層から分離する；ことからなる上記PHB分離方法が提供される。

そのような凝集法は英特許第1,082,005号および第1,881,805号明細書に記載されている。好ましくは、懸濁液のpHを8.5~12の値に上げ、懸濁液中に加圧スチームを射出して加熱し、次いで8~5のpHにまで酸性化することにより懸濁液を凝集させる。

スチームの量および流速は、固体懸濁液の温度を60~100℃にまで上昇させるようなものであるのが好ましい。

凝集された固体は、沈降、浮遊、遠心分離または乾燥処理（例えば噴霧乾燥）により水性媒体から分離しうる。

が有利でありうる。

脂質抽出工程（もし採用するならば）および/またはPHB抽出工程は、適当な際に充填された凝集固体について連続的に実施してよい。

本発明の好ましい一態様においては、脂質抽出後に、例えば硫酸炭酸薬液で、凝集固体を処理させる。このようにすると比較的多孔性の顆粒状物質が得られ、このものを次いでPHB抽出用溶剤と接触させることができる。我々は、このような顆粒物質を用いると、PHBがそれから容易に析出され、固体破片層が顆粒状のまま残ることを発見した。このような顆粒状の固体破片層は、前述のような方法によつて、PHB含有溶液から容易に分離できる。脂質抽出時の凝集固体の乾燥によつて得られる多孔性顆粒物質は、PHB用溶剤をその顆粒物質床内を下向きに透過させて実施する粗沈（トリクル）抽出法に特に適当である。

本発明の別の態様においては、凝集固体を、前述のような脂質抽出工程に対し、脂質抽出溶剤から分離し、次いで水に再スラリー化させる。かく

PHB抽出用溶剤との接触前に、凝集固体を、固体と関連した脂質を溶解しうるがPHBを溶解しえない溶剤と接触させるのが好ましい。そのような脂質抽出用溶剤の例としてはメタノールおよびアセトンがある。脂質の抽出は、昇温、例えば40~90℃で行うのが好ましいけれども、若干の場合には一層低い例えば25~40℃の温度でも充分な脂質抽出を行いうることができる。一般的には昇温の使用が好ましく、上記のような昇温を用いる場合には、凝集固体は脂質抽出用溶剤中で沈降し易く、かくしてデカンテーションのような方法での凝集固体と脂質抽出溶剤の分離を助長する傾向がある。

固体を次いでPHB抽出用溶剤と接触させる。好ましい抽出用溶剤の例としては、1, 2-ジクロロエタン、塩化メチレンおよびクロロホルムがある。脂質抽出予備処理を行わない場合には、PHBの抽出は約40℃以下の温度で行うのが好ましいが、脂質抽出予備処理を行う場合には一層高い温度、例えば50~90℃の温度を用いるの

して得られるスラリーは、水と非混和性であるが、PHBを溶解しうる媒体をそのスラリーに添加することにより、逆式抽出法（前述の欧州特許出願第151232号明細書参照）で処理しうる。

一般的には、さらに追加の固体破片処理（例えば前述の欧州特許出願第151232号明細書）において若下の場合に使用するために提案されているミーリング処理）は、凝集固体が一旦脂質抽出工程に付された場合には不要である。

水性スラリーをPHB抽出用溶剤と共に攪拌した後、二つの液体を分離させる。固体破片層は水性相に残留するが、PHBは溶剤相中に溶解される。前述のPHB抽出用溶剤、すなわちクロロホルム、1, 2-ジクロロエタンおよび塩化メチレンを、この湿式法によりPHBを抽出するのに使用できる。

逆式抽出前に脂質除去工程を行うので、二つの液体相でのエマルジョンの形成は防止され、両者の分離は比較的簡単である。

PHBは、抽出溶剤の回収から、非脂質、例え

はメタノール／水混合物中への沈降により、または前液の蒸発、例えば噴霧またはフラッシュ乾燥により、回収できる。

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

実施例 1

150g/ℓのバイオマス含量（そのうちの約45wt%はPHB）のアルカリゲネス・エウトロフス（*Alcaligenes eutrophus*）の水性懸濁液を、アルカリの添加によりそのpHを9とし、90℃に10分間加熱し、次いでpH5に酸性化することにより、凝集させた。得られたフロックをデカンテーションにより水性媒体から分離した。

その懸濁フロック100mlを200mlのメタノールに加え5分間沈沈した。次いでデカンテーションによりメタノールを除去し、得られたフロックを真空床で60℃で20分間乾燥した。顆粒状の生成物が形成された。

顆粒状生成物の10gを200mlのクロロホルムで5分間連続処理してPHBを抽出した。固体破片屑は顆粒状であり、クロロホルム溶液の上面

に浮いており、容易にそこからすくう取ることができる。

PHBを含むクロロホルム溶液をメタノールと水の混合物（メタノール：水＝4：1容積比）に加えることによりそのクロロホルム溶液からPHBを沈降させた。沈降PHBをろ過により回収し、オーブン中40℃で乾燥した。回収されたPHB量はアルカリゲネス・エウトロフス菌体中のその約80wt%に相当した。

回収PHBの重量平均分子量は、ゲル透過クロマトグラフィーで測定して270,000であった。

比較例

比較のために、200mlのクロロホルムで10gの乾燥菌体（上記水性懸濁液の噴霧乾燥により得た）を連続処理することによりPHB抽出した。固体破片屑は顆粒状であり、このものはクロロホルム溶液から非常に容易に分離できた。

実施例 2

実施例1を繰返したが、クロロホルムで顆粒状物を処理する代りに顆粒状物をシランソール・

メキサー中でクロロホルムと室温で混合した。固体破片屑は、比較例2よりもクロロホルム溶液から容易に分離できたが、実施例1の場合よりも分離が困難であった。

回収PHBの量は、菌体中のその約50wt%に相当した。

実施例 3

米国特許第3,085,959号明細書には浸漬液体をアセトンで処理してから、PHB抽出用溶剤で抽出することが提案されている。示唆されているアセトンの量は、固体重量の1～10倍である。

アセトンの効果を検討するため、約5重量%の菌体（そのうちの約50wt%がPHB）を含む水性懸濁液の試料に対し、異なる量のアセトンを添加し、それらの混合物を室温で2分間置とうした。

試料	アセトン ml	水性懸濁液 ml	結 果
A	10	90	認めうる効果なし。
B	50	50	菌体は部分的に浸出した外殻を脱したが、液相からの菌体の分離は生じなかつた。
C	90	10	菌体は部分的に浸出した外殻を脱した。約25mlの液相を占めて沈降した。

浸漬菌体または固体懸濁液をアセトンで処理する場合、大規模操作ではアセトン／水性懸濁液からアセトンを回収する必要が生ずるのであるから、乾燥菌体に対するアセトンの効果を検討した。

噴霧乾燥菌体（比較例で用いたもの）、または空気乾燥菌体（すなわち実施例1で用いた懸濁液から遠心分離および40℃の空気中での真空床乾燥により分離した菌体）の10gの量を、100mlのアセトンと共に室温で2分間置きませ、その懸濁液を1時間静置した。菌体は浸出した外殻を有

しないか、下表に示すようにある程度まで沈降した。

試料	沈降のタイプ	固体の重量 (g)	沈降固体の量 (g)
D	噴霧乾燥	2	痕 跡
B	"	5	約2
F	"	10	約8
G	風乾	2	痕 跡
H	"	5	約1
I	"	10	約5~6

試料CまたはFの沈降固体をデカンテーションで分離し、乾燥し、クロロホルムで逆流洗浄したとき、クロロホルム溶液からの固体破片屑の分離は比較例よりも密着ではなかつた。

特許出 願 人 インベリヤル・ケミカル・
 インダストリーズ・リミテッド

代 理 人 井 理 士 湯 浅 恭 三

(外2名)

第1頁の続き

優先権主張 ③1980年12月23日③イギリス
(GB)④8041182

⑦発 明 者 バーリー・アルダーソン
 イギリス国クリーブランド・ス
 トツクトン・オン・テイズ・
 ノートン・ザ・グリーン・ノー
 トン・ホール(番地なし)